

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

MODULARIO
I.C.A. - 101**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



REC'D 24 JUL 2000

WIPO PCT

IB00/00966

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

INV. IND.

N. VR99 A 000059

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

Roma, li 13.6.2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

DI CARLO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione AZIENDA PROVINCIALE PER I SERVIZI SANITARI N.C. AP
 Residenza 38100 Trento codice 01429410226
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome DORIGUZZI ING. ANDREA cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza FENZI & ASSOCIATI SRL
 via SAVAL n. 25 città VERONA cap. 37124 (prov) VR

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap. _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

"Procedimento per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze similari presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido e reattivo da utilizzarsi per la realizzazione dello stesso"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) VITALONE VINCENZO 3) GOTTARDI MASSIMO
 2) LOTTI ANDREA 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV n. pag. 32 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) ☒ PROV n. tav. 16 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) ☒ RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) ☒ RIS designazione inventore
 Doc. 5) ☐ RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) ☐ RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) ☐ nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire

=CINQUECENTOSESSANTACINQUEMILA=

obbligatorio

COMPILATO IL 20 07 1999 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) Il Mandatario: Doriguzzi Ing. AndreaCONTINUA SINO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

VERONA

codice 23

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

VR99A000059

Reg. A

L'anno milienovocento

NOVANTANOVE

il giorno

VENTI

del mese di

LUGLIO

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE

Elena Scarpone



L'UFFICIALE ROGANTE

Sesso Benedettina

VR99A000059

REG. B

DATA DI DEPOSITO 20/07/1999

DATA DI RILASCIO / /

NUMERO BREVETTO

"Procedimento per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze simili presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido e reattivo da utilizzarsi per la realizzazione dello stesso"

L. RIASSUNTO

Il procedimento comprende le seguenti fasi: preparazione di un campione di materiale finemente sminuzzato e/o in polvere; aggiunta, in provetta, di un opportuno reattivo allo stato liquido, capace di provocare l'estrazione e la trasformazione di cocaina in benzoilecgonina e contemporaneamente l'eventuale estrazione di altre sostanze simili, presenti nel campione; riscaldamento del contenuto della provetta ad una temperatura T_1 e mantenimento della detta temperatura T_1 per un intervallo di tempo t_1 ; raffreddamento della provetta fino a temperatura ambiente; esecuzione dello screening utilizzando un kit di reattivi destinati ai campioni di urina; e determinazione contemporaneamente della/delle quantità di sostanza/e presente/i.

M. DISEGNO



UR99A 0000 59

20 LUG. 1999



TITOLO: PROCEDIMENTO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI COCAINA ED ALTRE SOSTANZE SIMILARI PRESENTI IN UN CAMPIONE OTTENUTO PARTENDO DA UN MATERIALE SOLIDO E REATTIVO DA UTILIZZARSI PER LA REALIZZAZIONE DELLO STESSO.



Richiedente: AZIENDA PROVINCIALE PER I SERVIZI SANITARI,
Provincia Autonoma di Trento.

Inventori: VINCENZO VITALONE, ANDREA LOTTI e MASSIMO
GOTTARDI

D E S C R I Z I O N E

Campo di applicazione

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze simili, quali la morfina, il metadone, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido, ad esempio da capelli, con tecnica di screening, e ad un reattivo da utilizzarsi per la realizzazione del suddetto procedimento.

"Per tecniche di screening si intendono quei test che permettono di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata. Questi test permettono di escludere i campioni che sono negativi; identificano infatti quei campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la



concentrazione è al di sotto di un valore soglia (Cut-Off). Il valore soglia è una definizione operativa scelta per stabilire se il campione analizzato è positivo o negativo. Non bisogna però confondere il valore soglia con il limite di determinazione del metodo, che è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere determinata. Il valore soglia (Cut-Off) è normalmente fissato ad una concentrazione maggiore della sensibilità del metodo per ovviare alla imprecisione dell'analisi vicino ai limiti di sensibilità. ... questi valori (Cut-Off) sono convenzionali e tengono conto di molteplici fattori quali la possibilità di utilizzare reagenti in commercio, proprietà farmacocinetiche delle sostanze e necessità di evitare falsi negativi." (da Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. P. Zuccaro, S. Pichini, I. Altieri e R. Pacifini, pubblicato in RAPPORTI ISTISAN 96/29 a cura dell'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA')

Le sostanze che il metabolismo del corpo umano accumula nei capelli sono numerose, usualmente viene richiesta la rilevazione della presenza delle sostanze stupefacenti quali la morfina, il metadone e/o la cocaina, tuttavia con la presente invenzione si possono determinare la presenza e la quantità anche delle altre sostanze di seguito elencate:

6-O-monoacetilmorfina, diacetilmorfina, codeina, papaverina, nalorfina, nicotina, cotinina, caffeina, noscapina, mepivacaina, trimethopin, buprenorfina, pentazocina, metadone metabolita, benzoilecgonina metil estere, benzoilecgonina, amfetamina, metamfetamina, metilendiossiamfetamina, metilendiossimetamfetamina, metilendiossietilamfetamina, benzodiazepine, barbiturici.



Stato della tecnica.

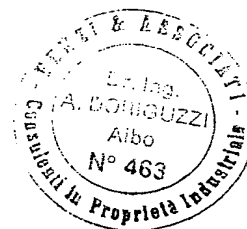
Sono note varie tecniche per la determinazione degli analiti di interesse, in particolare, per l'analisi della cocaina presente nei capelli sono note la gas cromatografia a spettrometria di massa (in seguito denominata "GC/MS") e la tecnica Radio Immuno Assay (R.I.A.).



La gascromatografia, o la cromatografia liquida, a spettrometria di massa è un metodo di risoluzione, purificazione o separazione e identificazione di componenti di miscele complesse di sostanze, organiche o inorganiche, aventi proprietà chimiche anche molto simili. La separazione di sostanze disciolte in un liquido o fissate su una sostanza solida finemente suddivisa o porosa, è basata sulla percolazione (eluizione) attraverso di esse di un gas o rispettivamente di un liquido, eluente. Quando le sostanze da rilevare/separare sono aeriformi e come eluente si usa un gas, si parla di gascromatografia (GC). La GC è un metodo di separazione basato sulla ripartizione fra una fase stazionaria solida o liquida ed una fase mobile costituita dalla miscela di gas o vapori da separare, trasportati da una corrente di gas inerte.

I risultati dell'analisi sono riportati in un grafico denominato cromatogramma, in cui le quantità dei singoli componenti presenti nella miscela e trasferiti al gas/liquido eluente sono riportate in funzione del tempo. Detto grafico presenta dei picchi tanto più alti quanto più elevata è la quantità di sostanza presente.

Le metodiche cromatografiche che possono essere usate per le conferme sono la gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida (LC) denominata comunemente cromatografia liquida ad alte prestazioni. I



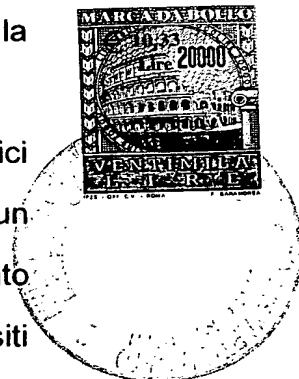
rivelatori più comunemente usati per la GC sono i detectors a cattura di elettroni e i detector azoto fosforo.

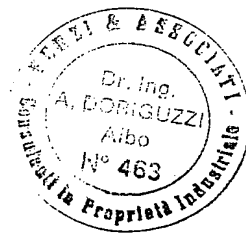
Il gas cromatografo può essere accoppiato ad uno spettrometro di massa ottenendo così una apparecchiatura adatta all'ottenimento della GC/MS. Con questa tecnica si uniscono le caratteristiche di separazione proprie della gascromatografia con la specificità propria della spettrometria di massa. L'accoppiamento con la spettrometria di massa rende il metodo assoluto poiché le sostanze vengono identificate in base al loro peso molecolare e/o frammenti chimici che producono per impatto con elettroni ad alta velocità, presenti nella sorgente ionica dello spettrometro. ... Per questi motivi la GC/MS attualmente può essere considerata la metodica di elezione per la conferma delle sostanze d'abuso ... e dei loro eventuali metaboliti." (da Proposta di linee guida per l'analisi delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici. dell'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', già citato)



Nella tradizionale idrolisi acida, mediante l'acido cloridrico HCl si riesce, tuttavia, ad estrarre la cocaina, mantenendola tale, cioè non trasformata nel suo metabolita denominato benzoilecgonina. Poiché le dosi di cocaina estratte sono molto piccole, non è possibile dosare la cocaina mediante usuali tecniche di screening.

La Radio Immuno Assay (R.I.A.) è basata su test radioimmunologici che utilizzano quantità note di anticorpi e di analita marcato con un radioisotopo (generalmente I 125). Durante l'incubazione l'analita marcato e quello eventualmente presente nel campione competono per i siti anticorpali. Dopo la precipitazione dei complessi antigene-anticorpo e la





centrifugazione, il sovranatante o il precipitato viene trasferito in un contatore gamma che misura il livello di radioattività. I kit R.I.A. vantano una eccezionale sensibilità, consentendo l'identificazione di 1-5 ng di sostanza per mL. L'adozione di strumenti automatici per la pipettazione e il conteggio permettono l'analisi contemporanea di numerosi campioni con tempi di risposta da 1 a 5 ore. D'altro canto l'uso di isotopi radioattivi rende necessarie adeguate misure di sicurezza. Inoltre, l'emivita fisica ridotta dei traccianti radioattivi impone una attenta gestione dei reagenti.



La R.I.A. non si presta ad essere diffusamente impiegata per la determinazione rapida di droghe in considerazione, in primo luogo, del costo elevato dei reagenti, accentuabile dalla labilità degli antisieri; secondariamente, considerando la delicatezza dell'analisi, derivante dal dover operare con materiale radioattivo molto pericoloso per gli operatori e dai tempi richiesti relativamente lunghi. Tale metodica richiede, inoltre, la predisposizione di stanze appositamente attrezzate e schermate, nonché una particolare cura nel maneggiare prima e nello smaltimento poi dei rifiuti.

La R.I.A., pertanto, ad eccezione dei limitati casi di cui sopra, è ormai poco usata.

Dall'esame delle tecniche anteriori emerge l'impossibilità di effettuare il dosaggio della cocaina presente nei capelli mediante le cosiddette tecniche di screening, descritte precedentemente, cioè tecniche molto rapide e poco costose, quali quelle normalmente utilizzate per la determinazione della quantità di droghe presenti nelle urine. Il motivo principale di tale impossibilità è dato dal fatto che nelle tecniche di



screening convenzionali viene rilevato il dosaggio non della cocaina stessa, ma bensì la concentrazione del metabolita della cocaina denominato benzoilecgonina. Il fatto che detto metabolita non esiste in natura se non come derivato dal metabolismo della cocaina e non di altra sostanza, e il fatto che la reazione di trasformazione della cocaina in benzoilecgonina, cioè la trasformazione del gruppo estere in acido carbossilico avviene in modo irreversibile in ambiente alcalino (OH^-) fanno sì che il rilevamento della benzoilecgonina sia condizione necessaria e sufficiente per il rilevamento della cocaina.



Detta benzoilecgonina si trova presente, nel caso del capello, normalmente in un rapporto di 1:4 rispetto alla cocaina stessa (in altri casi tale rapporto scende a 1:10 e oltre). Questo fa sì che nei casi in cui la concentrazione di cocaina sia molto bassa, cioè vicina ai valori limite di Cut-Off (0,2 – 0,1 ng di cocaina per mg di capello) non sia possibile effettuare lo screening per l'esigua concentrazione del metabolita (0,05 – 0.025 ng di benzoilecgonina per mg di capello) non rilevabile dalle strumentazioni di screening attualmente utilizzate nei laboratori di analisi.

Presentazione dell'invenzione

Scopo principale della presente invenzione è di eliminare l'inconveniente sopra lamentato, cioè di superare la suddetta impossibilità di dosare la cocaina presente in un campione, ottenuto partendo da un materiale solido, mediante tecniche di screening convenzionali. Questo scopo è raggiunto secondo la presente invenzione mediante per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze simili, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido,



mediante tecnica di screening, comprendente le seguenti fasi:

- preparazione di un campione costituito da 50 a 300 mg circa di materiale finemente sminuzzato e/o in polvere;
- aggiunta, nella provetta contenente detto campione, di un opportuno reattivo allo stato liquido, fino a completa immersione dello stesso, detto reattivo essendo capace di provocare l'estrazione e la trasformazione di cocaina in benzoilecgonina e contemporaneamente l'eventuale estrazione di altre sostanze simili, presenti nel campione;
- agitazione eventuale della provetta per facilitare l'immersione;
- riscaldamento del contenuto della provetta ad una temperatura T_1 e mantenimento della detta temperatura T_1 per un intervallo di tempo t_1 , mediante immersione della provetta in un bagno termostato o mediante inserimento della provetta in un forno;
- raffreddamento della provetta fino a temperatura ambiente;
- prelevamento del liquido e suo travaso in una provetta del tipo adatto all'inserimento in una strumentazione di screening;
- esecuzione dello screening utilizzando un kit di reattivi destinati ai campioni di urina;
- lettura dei dati emersi dalla strumentazione di 1° livello per verificare il valore della concentrazione rispetto al limite di Cut-Off; e
- determinazione contemporaneamente della/delle quantità di sostanza/e presente/i.



Grazie a questo procedimento è possibile ottenere la trasformazione quantitativa della cocaina, presente, ad esempio, nel capello, nel suo metabolita, benzoilecgonina, raggiungendo così una



concentrazione dello stesso metabolita tale da poter essere rilevato senza problemi con le normali e note tecniche di screening. Tale trasformazione avviene contemporaneamente alla estrazione della stessa cocaina dal capello, mediante l'ausilio di un opportuno reattivo.

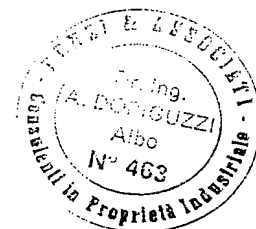
In accordo con un secondo aspetto della presente invenzione è stato previsto un procedimento per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze simili, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido con tecnica di screening comprendente le seguenti ulteriori fasi successive a quelle a quelle precedentemente illustrate:

- ordinamento dei campioni in base alle concentrazioni crescenti di sostanze ricercate, come precedentemente determinate, ed
- esecuzione delle analisi di conferma con tecniche note quali la gas GC/MS.

In accordo con un altro aspetto della presente invenzione è stato previsto l'uso di un reattivo da utilizzarsi in un per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze simili, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido, con tecnica di screening. Detto reattivo (in seguito indicato con VMA) è una soluzione tampone usata nel procedimento di trasformazione della cocaina nel suo metabolita, benzoilecgonina, per determinare quantitativamente con tecnica di screening, contemporaneamente, morfina, metadone e cocaina eventualmente presenti nei capelli.

La composizione del tampone di reazione (denominato in seguito reattivo VMA) è tale da fornire gruppi idrossili OH^- con una concentrazione molare





compresa tra 0,00001 M e 5,0 M, preferibilmente tra 0,00001M e 1,00 M.

La sua composizione è preferibilmente rappresentata dalla formula:



In cui $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ è ammoni fosfato bibasico e NH_4OH è idrato di ammonio.



Il principale vantaggio, offerto dalla soluzione proposta, consiste nel fatto che è possibile contemporaneamente estrarre la cocaina presente nel capello e trasformarla in benzoilecgonina, e che, quindi, è possibile determinare il dosaggio della cocaina stessa effettuando il dosaggio della benzoilecgonina, attraverso una tecnica di screening che utilizza sostanzialmente un kit precedentemente predisposto e ottimizzato per la determinazione della benzoilecgonina presente nell'urina. Ciò consente una riduzione notevole dei tempi di analisi ed un conseguente aumento di produttività del laboratorio d'analisi e, quindi, permette di ottenere un notevole abbattimento dei costi d'analisi.

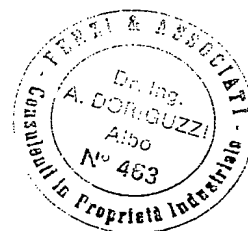
Un altro vantaggio è dato dal fatto che, mentre con la tecnica di riferimento (GC/MS) è necessario analizzare tutti i campioni (sia positivi che negativi) poiché con le tecniche di screening attuali non si può rilevare la concentrazione di cocaina, in quanto non esiste in commercio nessun kit specifico per la cocaina ma solo per la benzoilecgonina, la soluzione proposta consente di utilizzare la tecnica di riferimento solo per le conferme dei campioni risultati positivi nella prima analisi di screening. Supponendo che un operatore medio di laboratorio tratti 25 campioni, il tempo necessario per l'analisi e le relative conferme, con le tecniche finora note, è stimato in due ore per la preparazione più una settimana



per le analisi di conferma GC/MS di tutti i campioni (positivi e negativi). Con la tecnica secondo la presente invenzione, invece, per eseguire le analisi su altrettanti (25) campioni un operatore impiegherebbe due ore per la preparazione più trenta minuti per le analisi di screening più il tempo necessario per le eventuali conferme dei soli campioni risultati positivi. Poiché, mediamente, si può ipotizzare che i campioni positivi siano compresi tra lo 0% e il 20% e tenuto conto che la maggior parte del tempo complessivo d'analisi è quello impiegato per le conferme, ne consegue che la tecnica secondo la presente invenzione consente di risparmiare molto tempo, diciamo circa tra il 70% ed il 90% del tempo totale necessario per l'analisi dei 25 campioni.



Un altro vantaggio è dato dal fatto che con la tecnica secondo la presente invenzione si minimizzano, se non addirittura si eliminano, gli eventuali inquinamenti dei campioni per trascinamento nell'analisi di conferma. Infatti, dai risultati della prima analisi di screening è possibile stabilire un ordine crescente dei campioni contenenti le sostanze ricercate, in base alle concentrazioni trovate per le stesse, e procedendo all'esame di conferma partendo prima dai campioni con concentrazioni più basse e via via procedendo con i campioni a concentrazioni più elevate. Si evita così il rischio di esaminare prima un campione con elevate concentrazioni di sostanza ricercata, che potrebbe lasciare delle tracce nelle attrezzature usate per l'analisi, con il conseguente possibile inquinamento delle analisi su un successivo campione avente, per esempio, una concentrazione della sostanza di poco al di sotto del limite di Cut-Off.



Un ulteriore vantaggio è dato dal fatto che, con la tecnica secondo la presente invenzione, si possono ricercare contemporaneamente, con la stessa analisi e nello stesso campione, oltre alla cocaina anche altre sostanze, quali ad esempio la morfina utilizzando gli stessi limiti di Cut-Off o il metadone, modificando opportunamente il limite di Cut-Off.

Un altro vantaggio è dato dal fatto che, la tecnica secondo la presente invenzione offre una garanzia maggiore all'operatore. Il fatto che la positività venga confermata con due differenti tipi di tecniche analitiche, garantisce, infatti, all'operatore una maggior affidabilità o sicurezza operativa.

Breve descrizione delle Figure

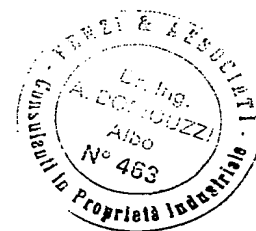
Ulteriori caratteristiche e vantaggi appariranno dalla seguente descrizione dettagliata, nella quale sono illustrati alcuni possibili esempi di realizzazione della presente invenzione, dati a titolo non limitativo, con riferimento agli allegati disegni, nei quali:

la Figura 1 è un cromatogramma prodotto da una apparecchiatura che svolge una gascromatografia sullo stesso campione di cui a Tabella II;

la Figura 2 è il grafico ottenuto con una spettrometria di massa eseguita sul primo campione trattato con idrolisi acida, relativo alla presenza di cocaina;

la Figura 3 è il grafico ottenuto con una spettrometria di massa eseguita sul primo campione trattato con la tecnica secondo la presente invenzione, relativo alla presenza di benzoilecgonina;

la Figura 4 è il grafico ottenuto con una spettrometria di massa



eseguita sul primo campione trattato con la tecnica secondo la presente invenzione, relativo alla presenza di morfina;

la Figura 5 è una cromatogramma analogo a quella di Figura 1, relativa al primo campione trattato con la tecnica secondo la presente invenzione, di cui a Tabella III;

la Figura 6 è una vista analogo a quella di Figura 2, relativa al primo campione trattato con la tecnica secondo la presente invenzione, relativo alla presenza di benzoilecgonina;

la Figura 7 è una vista analogo a quella di Figura 3, relativa al primo campione trattato con la tecnica secondo la presente invenzione, relativo alla presenza di morfina;

la Figura 8 è una vista analogo a quella di Figura 1, relativa ad un secondo campione di esempio;

la Figura 9 è una vista analogo a quella di Figura 5, relativa ad un secondo campione di esempio;

le Figure 10 e 11 sono viste analoghe a quelle delle Figure 8 e 9, relative ad un terzo campione di esempio;

le Figure 12 e 13 sono viste analoghe a quelle delle Figure 8 e 9, relative ad un quarto campione di esempio;

la Figura 14 è un vista diagrammatica che illustra il metabolismo di trasformazione della cocaina nel suo metabolita, benzoilecgonina;

la Figura 15 è un grafico che presenta la concentrazione della cocaina in funzione della concentrazione degli ossidril OH⁻ nel caso in cui la reazione di trasformazione della cocaina in benzoilecgonina sia svolta ad una temperatura di 100°C per un tempo di un'ora; e

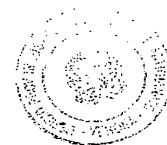




la Figura 16 è un grafico analogo a quello di figura precedente, nel caso in cui la reazione di trasformazione della cocaina in benzoilecgonina sia svolta ad una temperatura di 150°C per un tempo di un'ora.

Descrizione dettagliata di alcuni esempi di realizzazione

Il procedimento secondo la presente invenzione è un procedimento per l'estrazione e la trasformazione quantitativa di cocaina in benzoilecgonina e per l'eventuale estrazione di altre sostanze simili, in particolare sostanze tossiche e/o droghe, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido. Nell'esempio di realizzazione dell'invenzione che descriveremo di seguito detto campione è stato ottenuto partendo da capelli sminuzzati.



Detto procedimento consente, in particolare, il dosaggio della cocaina, con tecnica di screening, contemporaneamente al dosaggio di eventuali altre sostanze tossiche o simili presenti nel capello, utilizzando i kits di reattivi che si trovano già in commercio e predisposti per le analisi delle urine.

Detto procedimento, nel caso particolare di un campione ottenuto da capelli, comprendente le seguenti fasi:

- sminuzzamento del capello da esaminare in frammenti, preferibilmente di lunghezza da 2 a 3 mm, in modo tale da favorire l'immersione del capello stesso in un reagente liquido;
- pesata dei frammenti in modo da formare un campione avente un peso, preferibilmente compreso tra 50 e 300 mg circa;
- lavaggio dei frammenti di capello in provetta a tenuta, a temperatura ambiente, mediante metanolo per togliere eventuali inquinamenti esterni,



(quali, ad esempio, tracce di droga esterna al capello depositatasi sul capello perché presente nell'aria: in tal modo è possibile distinguere se il capello apparteneva ad uno spacciatore non consumatore o invece apparteneva ad un consumatore effettivo di droga) e altre sostanze esterne al capello;

- ripetizione eventuale del lavaggio con metanolo;
- lavaggio dei frammenti di capello in provetta a tenuta con etere etilico per solubilizzare eventuali residui di metanolo o acqua;
- asciugatura a circa 45°C in forno o con un flusso di un ga inerte quale ad esempio l'azoto;
- aggiunta in provetta di un opportuno reattivo allo stato liquido, fino a completa immersione dei frammenti di capello nel reattivo, (la quantità necessaria per il suddetto campione può essere compresa in un intervallo da 0,5 a 2,0 ml circa);
- agitazione eventuale della provetta per facilitare l'immersione dei frammenti nel reattivo;
- riscaldamento del contenuto della provetta fino a 100°C e mantenimento di detta temperatura per un'ora, mediante immersione della provetta in un bagno termostato o mediante un forno;
- raffreddamento della provetta fino a temperatura ambiente, immergendola, ad esempio, in acqua fredda, o lasciandola all'aria a temperatura ambiente;
- prelevamento del liquido e suo travaso in una provetta del tipo utilizzato per l'esame delle urine;
- eventuale centrifugazione per eliminare il torbido;





- inserimento della provetta in una strumentazione di 1° livello o di screening per la determinazione quantitativa delle sostanze ricercate (benzoilecgonina, morfina, metadone, etc...);
- taratura della strumentazione di 1° livello in modo adatto alle piccole quantità; ciò si rende necessario se l'apparecchiatura viene alternativamente utilizzata per esaminare capelli ed urine;
- esecuzione dello screening utilizzando i reattivi forniti con il kit utilizzato usualmente nel caso dell'esame dell'urina;
- lettura dei dati emersi dalla strumentazione di 1° livello per verificare il valore della concentrazione rispetto al limite di Cut-Off e stabilire, quindi, la presenza o meno delle sostanze ricercate.



Il procedimento sopra esposto può essere poi completato dalle seguenti ulteriori fasi:

- ordinamento dei campioni in base alle concentrazioni crescenti di sostanze ricercate, come precedentemente determinate, ed
- esecuzione delle analisi di conferma con tecniche note quali la GC/MS.

L'ordinamento dei campioni consente di evitare i cosiddetti inquinamenti da trascinamento di cui si è precedentemente parlato.

Il procedimento secondo la presente invenzione prevede l'uso di un reattivo (in seguito indicato con VMA) che è una soluzione tampone. Detta soluzione tampone viene usata per trasformare la cocaina presente nel capello nel suo metabolita, benzoilecgonina, come è illustrato nello schema di Figura 14. La cocaina in presenza di ossidril OH- ad una certa temperatura si trasforma prima in un prodotto intermedio e successivamente in benzoilecgonina più CH_3OH .



Va ricordato che le soluzioni tampone sono delle soluzioni ottenute facendo reagire un sale con una sua base debole; la soluzione così ottenuta presenta un pH stabile, in tal modo il detto reattivo VMA è in grado di produrre ossidrili OH^- in modo regolare e quindi il reattivo lavora in condizioni maggiormente stabili. L'utilizzo di soluzioni, in cui la produzione degli ossidrili OH^- non è regolare, crea problemi nei casi in cui la concentrazione della cocaina da rilevare è vicina ai limiti di Cut-Off.



La composizione del tampone di reazione (denominato in seguito reattivo VMA) è preferibilmente rappresentata dalla formula :



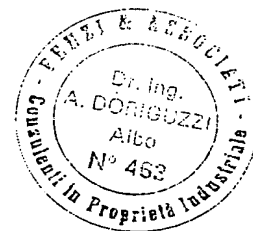
in cui $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ è ammonio fosfato bibasico e NH_4OH è idrato di ammonio.

Il procedimento secondo la presente invenzione consente, quindi, di determinare quantitativamente con tecnica di screening, contemporaneamente, morfina, metadone e cocaina eventualmente presenti nei capelli.

Il procedimento secondo la presente invenzione prevede anche che il reagente VMA possa essere sostituito da una soluzione in cui il soluto, una sostanza fonte di ossidrili OH^- , scelto tra i seguenti:

alluminio idrossido, bario idrossido ottaidrato, benziltriethylammonio idrossido, benziltrimetilammonio idrossido, calcio idrossido, fenilmercurio idrossido, litio idrossido litio idrossido monoidrato, magnesio idrossido, potassio idrossido, potassio idrossiantimoniato, sodio idrossido, sodio





idrossido monoidrato, stronzio idrossido ottaidrato, tetrametilammonio idrossido, tetrapropilammonio idrossido, trimetilvinilammonio idrossido, è disciolto in un solvente scelto tra i seguenti:

etanolo, metanolo, acqua, ammonio fosfato monobasico, ammonio acetato, ammonio benzoato, ammonio bicarbonato, ammonio bicromato, ammonio bisolfato, ammonio bromuro, ammonio carbamato, ammonio carbonato, ammonio citrato bibasico, ammonio cloruro, ammonio cromato, ammonio ioduro, molibdato, ammonio monovanadato, ammonio nitrato, ammonio ossalato monoidrato, ammonio persolfato, ammonio solfato, ammonio solfamato, ammonio solfito, ammonio solfuro, ammonio tartrato, ammonio tiocianato, ammonio tioglicolato, ammonio tiosolfato, ammonio cloruro, sodio fosfato monobasico, sodio fosfato bibasico, potassio fosfato monobasico, potassio fosfato bibasico.



In Figura 15 è illustrato il grafico che riporta la percentuale di cocaina trasformata in benzoilecgonina in funzione della concentrazione degli ossidril OH⁻ nel caso in cui la reazione di trasformazione è avvenuta ad una temperatura T₁ di 100°C mantenuta per un'ora. Dalla forma del grafico appare evidente che la trasformazione si mantiene a percentuali molto elevate (circa 80%) per un intervallo di valori della concentrazione di OH⁻ compresi tra 0,08 e 0,64 molare. Dal grafico illustrato in Figura 16, che riporta la concentrazione di OH⁻ rilevate rispettivamente dopo 0, 15, 30 e 60 minuti nel caso di un riscaldamento ad una temperatura T₁ di 150°C, appare evidente che la percentuale della cocaina trasformata rimane elevata solo in un breve intorno del punto di ascissa 15 minuti.

Dai grafici sopra riportati a titolo di esempio e da numerose altre



prove eseguite e non riportate è emerso che i valori ottimali per la temperatura T_1 e l'intervallo di tempo t_1 , durante il quale il reattivo VMA della presente invenzione trasforma la cocaina in benzoilecgonina, sono rispettivamente di 100°C e di un'ora.

Vengono ora di seguito riportati quattro esempi di determinazione quantitativa della cocaina nel capello eseguite con tecniche note e con il procedimento secondo la presente invenzione.



Tutte le analisi sono state svolte con le seguenti strumentazioni:

per le analisi di screening si è utilizzato una strumentazione della ditta ROCHE denominata "COBAS MIRA PLUS" utilizzando i reattivi forniti dalla stessa ditta e denominati "ABUSCREEN ON LINE";

per la gascromatografia (GC/MS) si è utilizzata la strumentazione fornita dalla ditta VARIAN denominata "SATURN GC/MS/MS) modello 4D".

Esempi

Prima di procedere alle varie analisi di screening l'apparecchiatura è stata controllata con un campione positivo sia alla cocaina che alla morfina per verificare la funzionalità della metodica e, come si vede dalla Tabella I, il campione è effettivamente risultato positivo sia alla cocaina che alla morfina, come indicato dalla scritta "POSITIVO".

TABELLA I

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.16	POSITIVO
COCAINA	0.15	POSITIVO



I valori di concentrazione rilevati dall'apparecchiatura sono risultati per la morfina 0,16 e per la cocaina 0.15 in linea con i valori attesi di 0.15 per entrambe le sostanze presenti nel campione di controllo usato.

Esempio 1

Il primo esempio è costituito da un campione che, al termine delle analisi, è risultato essere positivo sia alla cocaina che alla morfina.

Il campione è stato sottoposto ad una analisi tradizionale del tipo a idrolisi acida, e quindi sottoposto ad analisi di screening. i risultati di quest'ultima sono riprodotti nella Tabella II.

TABELLA II

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE** ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.13	POSITIVO
COCAINA	0.01	NEGATIVO

Mediante l'acido cloridrico HCl si è riusciti ad estrarre una quantità di morfina (0.13) superiore al limite, come segnalato dallo screening. Al contrario la quantità di cocaina estratta (0.01), essendo la cocaina stata mantenuta tale, cioè non trasformata nel suo metabolita benzoilecgonina, è risultata troppo piccola per consentire all'apparecchiatura di rilevarla. Ricordiamo che le tecniche di screening attuali, rilevano la presenza del metabolita della cocaina e non della cocaina stessa.

Successivamente lo stesso campione è stato sottoposto ad una analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nelle



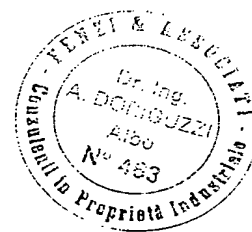


figure 1, 2, 3 e 4. In particolare, dalla figura 1 si nota che il cromatogramma del primo campione mostra un elevato picco in corrispondenza della posizione della cocaina ed un picco molto più piccolo in corrispondenza della posizione della benzoilecgonina. Ciò conferma che con l'idrolisi acida è stata estratta la cocaina, come tale, cioè non trasformata nel suo metabolita benzoilecgonina. Dalla stessa figura 1 emerge poi la conferma della presenza della morfina. Ulteriori conferme della presenza sia della cocaina che della morfina risultano dai grafici riprodotti rispettivamente nelle Figure 2, 3 e 4.



Quindi, il campione dell'Esempio 1 trattato con il procedimento secondo la presente invenzione è stato sottoposto ad analisi di screening i cui risultati sono riportati in Tabella III.

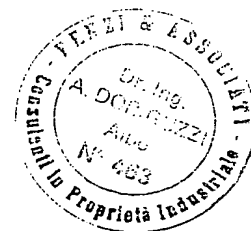
TABELLA III

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.23	POSITIVO
COCAINA	0.37	POSITIVO

Appare subito evidente che i valori rilevati per la morfina (0,23) e per la cocaina (0,37) sono entrambi superiori a limiti e pertanto il campione è positivo sia alla morfina che alla cocaina. Il valore così alto per la "COCAINA" deve essere attribuito alla benzoilecgonina che è stata prodotta durante il procedimento di trasformazione della cocaina nel suo metabolita nel procedimento della presente invenzione.



Anche il campione dell'Esempio 1 trattato con il procedimento



secondo la presente invenzione è stato sottoposto ad analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nelle Figure da 5 a 7. Come si può vedere dalla Figura 5, il picco della cocaina non è praticamente più presente, in quanto la stessa è stata completamente trasformata in benzoilecgonina, il cui picco molto elevato è ben visibile nella stessa Figura 5.



Con il procedimento secondo invenzione la positività è stata confermata con due tipi differenti di tecniche d'analisi.

Esempio 2

Il secondo esempio è costituito, ancora, da un campione che, al termine delle analisi, è risultato essere positivo, sia alla cocaina che alla morfina.

Il campione del secondo Esempio è stato anch'esso sottoposto prima ad una analisi tradizionale del tipo a idrolisi acida, e quindi sottoposto ad analisi di screening. I risultati di quest'ultima sono riprodotti nella Tabella IV.

TABELLA IV

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng./ml.	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.32	POSITIVO
COCAINA	0.03	NEGATIVO

Mediante l'acido cloridrico HCl si è riusciti ad estrarre una quantità



di morfina (0.32) superiore al limite, come segnalato dallo screening. Al contrario la quantità di cocaina estratta (0.03), è risultata troppo piccola per consentire all'apparecchiatura di rilevarla.

Successivamente il campione è stato sottoposto ad una analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nella figura 8. In particolare, si nota che il cromatogramma del campione del secondo Esempio mostra un elevato picco in corrispondenza della posizione della cocaina ed un picco trascurabile in corrispondenza della posizione della benzoilecgonina. Ciò conferma che con l'idrolisi acida è stata estratta la cocaina, come tale, cioè non trasformata nel suo metabolita benzoilecgonina. Dalla stessa figura 8 emerge poi la conferma della presenza della morfina.

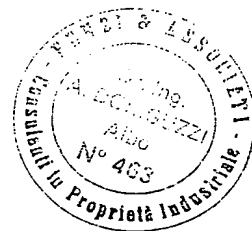


Quindi, il campione dell'Esempio 2, trattato con il procedimento secondo la presente invenzione, è stato sottoposto ad analisi di screening i cui risultati sono riportati in Tabella V.

TABELLA V

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.28	POSITIVO
COCAINA	0.99	POSITIVO

Appare subito evidente che i valori rilevati per la morfina (0,28) e per la cocaina (0,99) sono entrambi superiori a limiti e pertanto il campione è positivo sia alla morfina che alla cocaina. Il valore così alto per la "COCAINA" deve essere attribuito alla benzoilecgonina ottenuta dalla



trasformazione della cocaina nel procedimento secondo la presente invenzione.

Anche il campione dell'Esempio 2, trattato con il procedimento secondo la presente invenzione, è stato sottoposto ad analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nella Figura 9. Appare evidente dall'osservazione della Figura 9, che il picco della cocaina non è praticamente più presente, in quanto la stessa è stata completamente trasformata in benzoilecgonina, il cui picco è, invece molto elevato e ben visibile.



Anche in questo caso, con il procedimento secondo invenzione la positività è stata confermata con due tipi differenti di tecniche d'analisi:

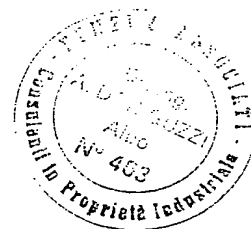
Esempio 3

Il terzo esempio è costituito da un campione che, al termine delle analisi, è risultato essere positivo solo alla cocaina e non alla morfina.

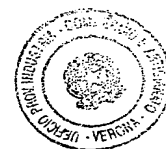
Il campione del terzo Esempio è stato anch'esso sottoposto prima ad una analisi tradizionale del tipo a idrolisi acida, e quindi sottoposto ad analisi di screening. I risultati di quest'ultima sono riprodotti nella tabella VI.

TABELLA VI

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng/ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.02	NEGATIVO
COCAINA	0.01	NEGATIVO



Mediante l'acido cloridrico HCl si è riusciti ad estrarre una quantità di morfina (0.02) inferiore al limite, come segnalato dallo screening. Anche la quantità di cocaina estratta (0.01), è risultata troppo piccola per consentire all'apparecchiatura di rilevarla. In base a questi risultati ottenuti con la tecnica nota non si può dire nulla sulla positività o meno del campione, ma occorre ricorrere alla conferma con la GC/MS. Pertanto il campione è stato sottoposto ad una analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nella figura 10. In particolare, si nota che il cromatogramma del campione del terzo Esempio mostra un elevato picco in corrispondenza della posizione della cocaina ed un picco trascurabile in corrispondenza della posizione della benzoilecgonina. Ciò conferma che con l'idrolisi acida è stata estratta la cocaina, come tale, cioè non trasformata nel suo metabolita benzoilecgonina.



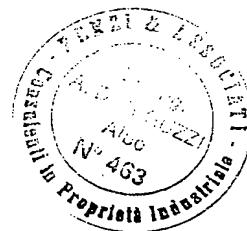
Quindi, anche il campione dell'Esempio 3, trattato con il procedimento secondo la presente invenzione, è stato sottoposto ad analisi di screening i cui risultati sono riportati in Tabella VII.

TABELLA VII

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.03	NEGATIVO
COCAINA	0.13	POSITIVO



Appare subito evidente che mentre il valore rilevato per la morfina (0,03) è inferiore al limite, il valore per la cocaina (0,13) di poco superiore al limite di Cut-Off e pertanto il campione è positivo solo alla cocaina.



Anche il campione dell'Esempio 3, trattato con il procedimento secondo la presente invenzione, è stato sottoposto ad analisi di conferma con tecnica GS/MS, i cui risultati sono riportati nella Figura 11. Appare evidente dall'osservazione della Figura 11, che il picco della cocaina non è praticamente più presente, in quanto la stessa è stata completamente trasformata in benzoilecgonina, il cui picco è, invece molto elevato e ben visibile. La GC/MS ha confermato, quindi, i risultati dell'analisi secondo la presente invenzione.



Esempio 4

Il quarto esempio è costituito da un campione che, al termine delle analisi, è risultato essere positivo alla cocaina, ma non alla morfina.

Le analisi sono state svolte con la stessa successione degli esempi precedenti. Dalla Tabella VIII si vede che in base all'analisi con l'idrolisi acida il campione sembra completamente negativo (sia alla morfina che alla cocaina), mentre la conferma con la GC/MS (Figura 12) ha evidenziato la presenza di cocaina superiore al limite.

TABELLA VIII

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.02	NEGATIVO
COCAINA	0.05	NEGATIVO

Lo stesso campione trattato con il reagente VMA secondo l'invenzione ha evidenziato già nella prima analisi di screening (Vedi

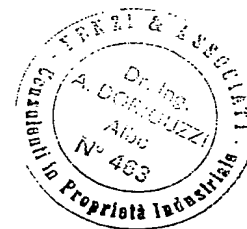


Tabella IX) la presenza di cocaina (0,64) superiore al limite di norma.

TABELLA IX

SOSTANZA	CONCENTRAZIONE ng / ml	POSITIVITA'/NEGATIVITA'
MORFINA	0.02	NEGATIVO
COCAINA	0.64	POSITIVO

Tale risultato è poi stato confermato dall'analisi GC/MS i cui risultati sono illustrati in Figura 13. L'enorme picco di benzoilecgonina indica che, prima del trattamento, il campione conteneva cocaina in percentuale superiore al limite di Cut-Off.





RIVENDICAZIONI.

1. Procedimento per la determinazione quantitativa di cocaina ed altre sostanze similari, presenti in un campione ottenuto partendo da un materiale solido, mediante tecnica di screening, comprendente le seguenti fasi:

- preparazione di un campione costituito da 50 a 300 mg circa di materiale finemente sminuzzato e/o in polvere;
- aggiunta, nella provetta contenente detto campione, di un opportuno reattivo allo stato liquido, fino a completa immersione dello stesso, detto reattivo essendo capace di provocare l'estrazione e la trasformazione di cocaina in benzoilecgonina e contemporaneamente l'eventuale estrazione di altre sostanze similari presenti nel campione;
- agitazione eventuale della provetta per facilitare l'immersione;
- riscaldamento del contenuto della provetta ad una temperatura T_1 e mantenimento della detta temperatura T_1 per un intervallo di tempo t_1 , mediante immersione della provetta in un bagno termostato o mediante inserimento della provetta in un forno;
- raffreddamento della provetta fino a temperatura ambiente;
- prelevamento del liquido e suo travaso in una provetta del tipo adatto all'inserimento in una strumentazione di screening;
- esecuzione dello screening utilizzando un kit di reattivi destinati ai campioni di urina;
- lettura dei dati emersi dalla strumentazione di 1° livello per verificare il valore della concentrazione rispetto al limite di Cut-Off; e





- determinazione contemporaneamente della/delle quantità di sostanza/e presente/i.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui detto procedimento comprende le ulteriori fasi di:

- ordinamento dei campioni in base ai valori crescenti delle concentrazioni di sostanze ricercate, determinate col detto procedimento; ed
- esecuzione delle analisi di conferma su detti campioni con tecniche note quali la GC/MS)



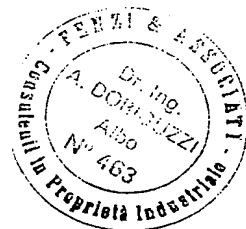
3. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 e/o 2, in cui nella fase di riscaldare il contenuto della provetta, la temperatura T_1 è compresa tra 10°C e 250°C, preferibilmente tra 35°C e 150°C ed in cui detta temperatura è mantenuta per un intervallo di tempo t_1 rispettivamente compreso tra 48 ore e pochi secondi, preferibilmente tra 24 ore e 15 minuti.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui nella fase di riscaldare il contenuto della provetta, la temperatura T_1 è preferibilmente mantenuta a 100 °C per un intervallo di tempo t_1 di un'ora.

5. Procedimento secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detto campione è ottenuto con le seguenti fasi:

- sminuzzamento in frammenti di almeno un capello da esaminare;
- pesata dei frammenti in modo da formare un campione da 50 a 300 mg





circa;

- lavaggio dei frammenti di capello in una provetta a tenuta, a temperatura ambiente, immergendoli in un detergente liquido, agitando la detta provetta contenente i frammenti di capello ed il detergente filtrando quindi il tutto per separare i frammenti dal detergente contenente le impurità;
- ripetizione eventuale del lavaggio con una nuova dose dello stesso detergente;
- lavaggio dei frammenti di capello in provetta a tenuta con un alcool in grado di solubilizzare eventuali residui di detergente o acqua;
- asciugatura dei frammenti di capello in forno o con flusso di gas inerte;
- inserimento dei frammenti di capello in una provetta adatta.

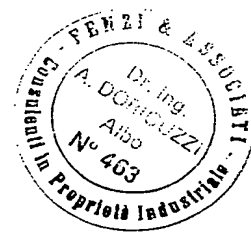


6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui la lunghezza dei frammenti dei capelli è preferibilmente compresa tra 2 e 3 mm.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il detergente liquido è preferibilmente metanolo.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il secondo lavaggio è effettuato con etere etilico che solubilizza eventuali residui di metanolo o acqua;

9. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui la temperatura del forno è preferibilmente compresa tra 40°C e 50°C;



10. Procedimento secondo una delle precedenti rivendicazioni, in cui il detto reattivo è una soluzione tampone (VMA) in grado di fornire gruppi idrossili OH^- con una concentrazione molare compresa tra 0,00001 M e 5,0 M, preferibilmente tra 0,00001M e 1,00 M, la cui composizione è preferibilmente rappresentata dalla formula :



In cui $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ è ammonio fosfato bibasico e NH_4OH è idrato di ammonio



11. Procedimento secondo la rivendicazione 10, in cui il detto reattivo (VMA) è una soluzione formata da un soluto scelto tra i seguenti:

alluminio idrossido, bario idrossido ottaidrato, benziltriethylammonio idrossido, benziltrimetilammonio idrossido, calcio idrossido, fenilmercurio idrossido, litio idrossido litio idrossido monoidrato, magnesio idrossido, potassio idrossido, potassio idrossiantimoniato, sodio idrossido, sodio idrossido monoidrato, stronzio idrossido ottaidrato, tetrametilammonio idrossido, tetrapropilammonio idrossido, trimetilvinilammonio idrossido, disciolto in un solvente scelto tra i seguenti:

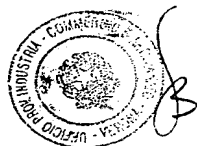
etanolo, metanolo, acqua, ammonio fosfato monobasico, ammonio acetato, ammonio benzoato, ammonio bicarbonato, ammonio bicromato, ammonio bisolfato, ammonio bromuro, ammonio carbamato, ammonio carbonato, ammonio citrato bibasico, ammonio cloruro, ammonio cromato, ammonio ioduro, molibdato, ammonio monovanadato, ammonio nitrato, ammonio ossalato monoidrato, ammonio persolfatato, ammonio solfato, ammonio solfamato, ammonio solfito, ammonio solfuro, ammonio tartrato,



ammonio tiocianato, ammonio tioglicolato, ammonio tiosolfato, ammonio
cloruro, sodio fosfato monobasico, sodio fosfato bibasico, potassio fosfato
monobasico, potassio fosfato bibasico.



[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

VR99A000059

TAV. 1/16

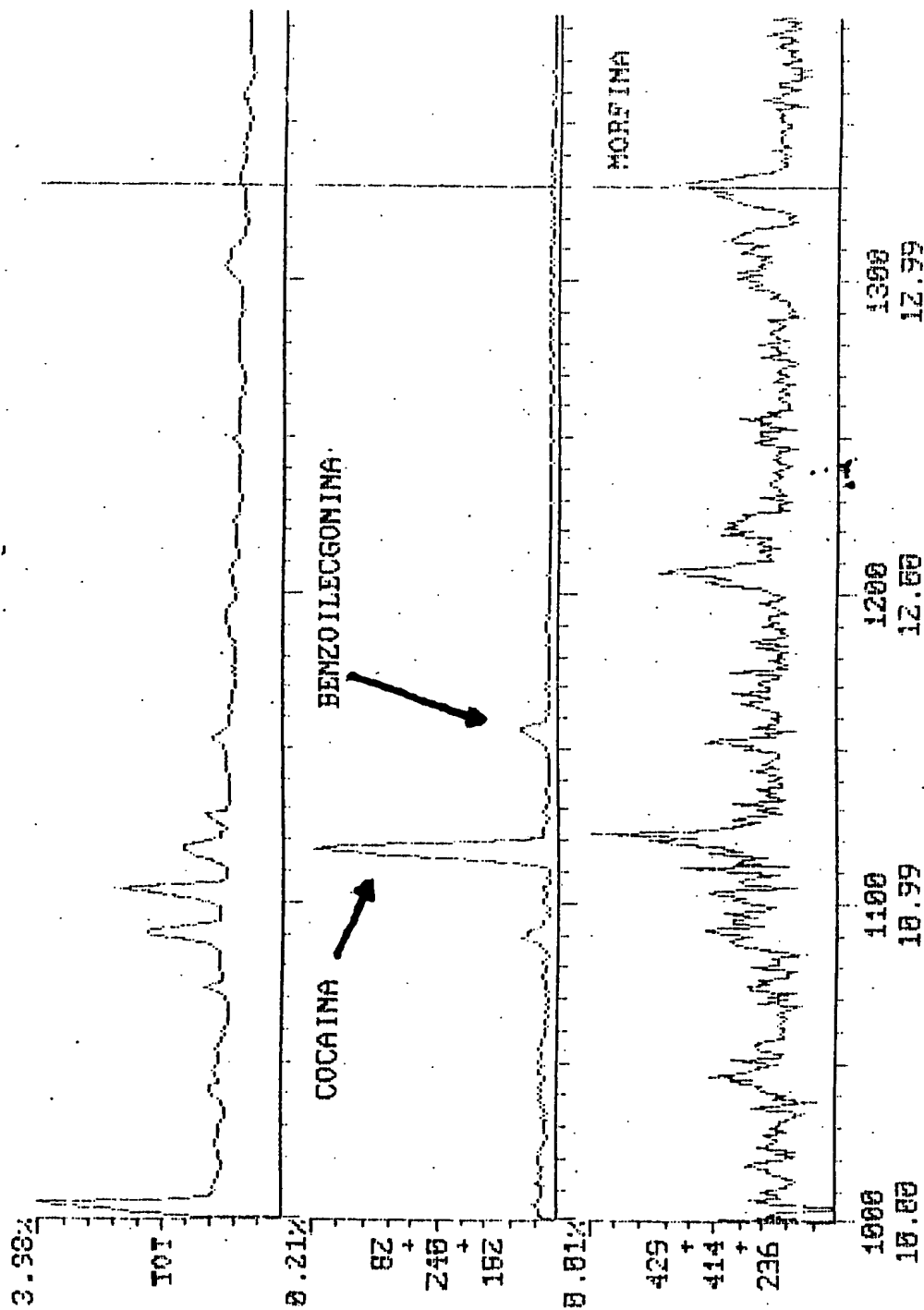


FIG. 1



UR99A 000059

TAV. 2/16

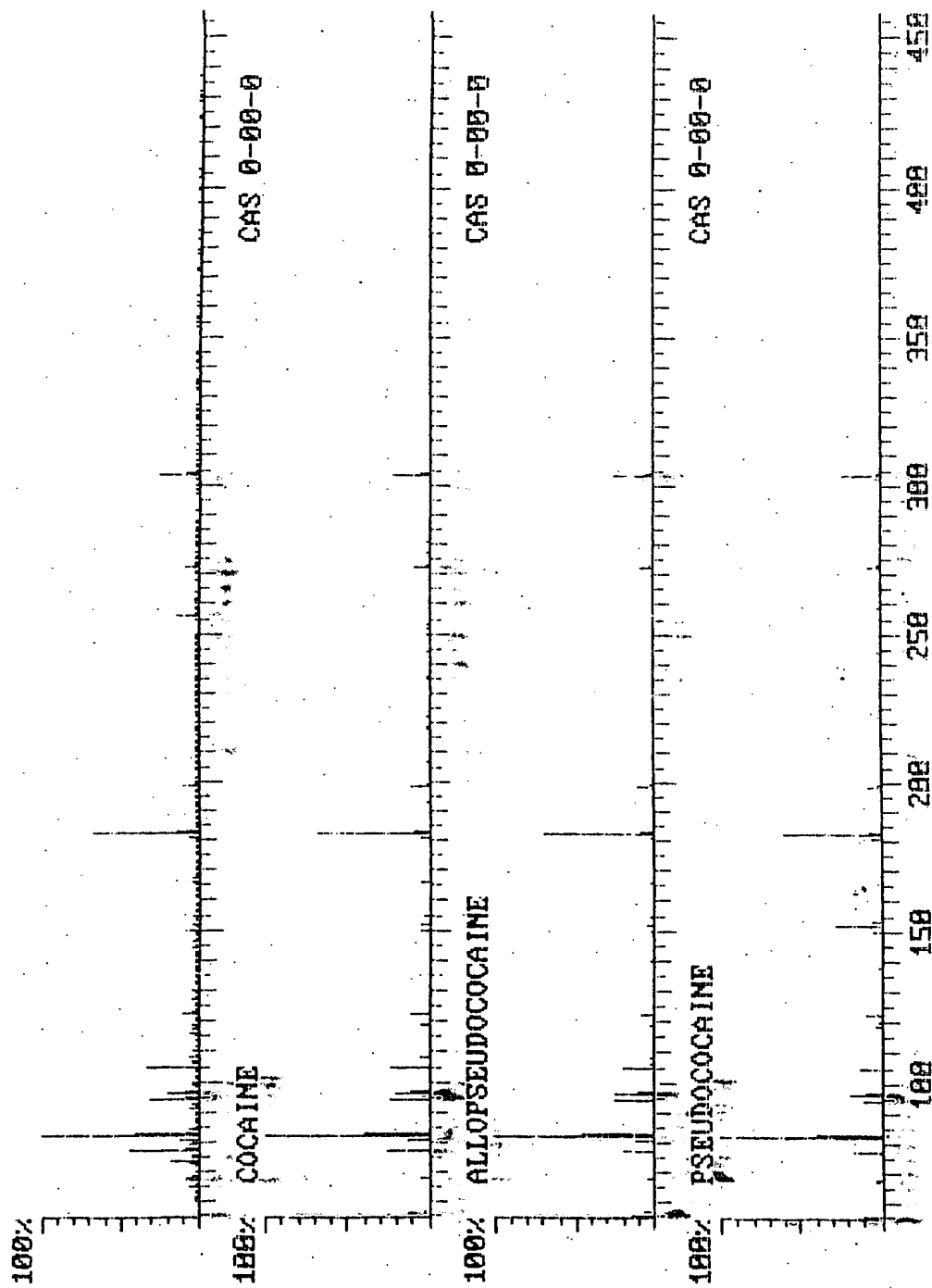
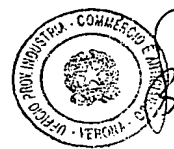
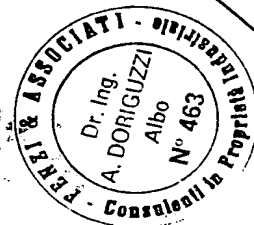


FIG.2



UR99A000059

TAV. 3/16

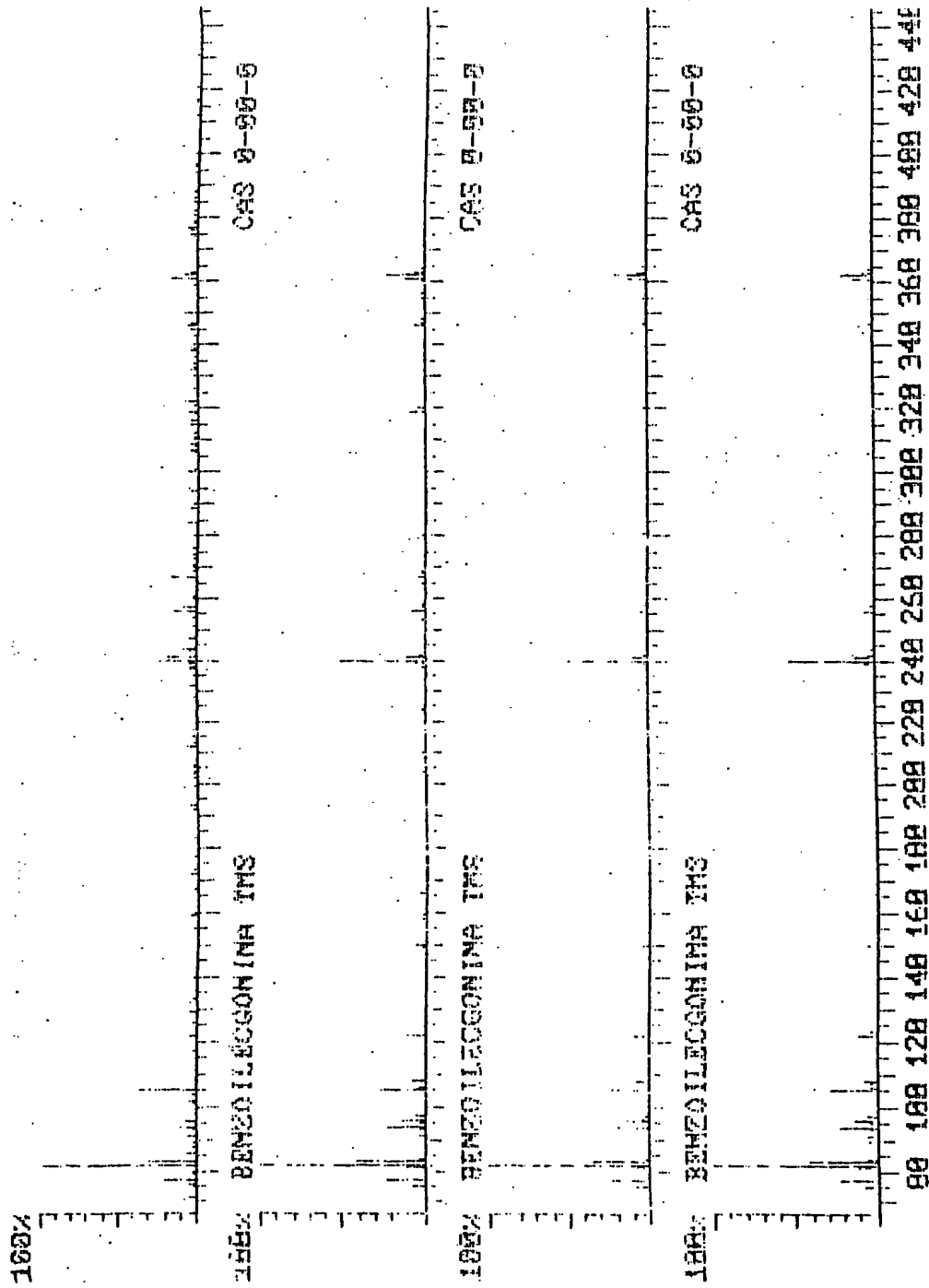
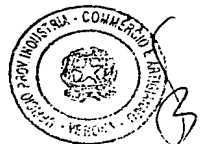
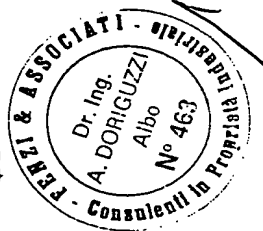


FIG. 3



UR99A000059

TAV. 4/16

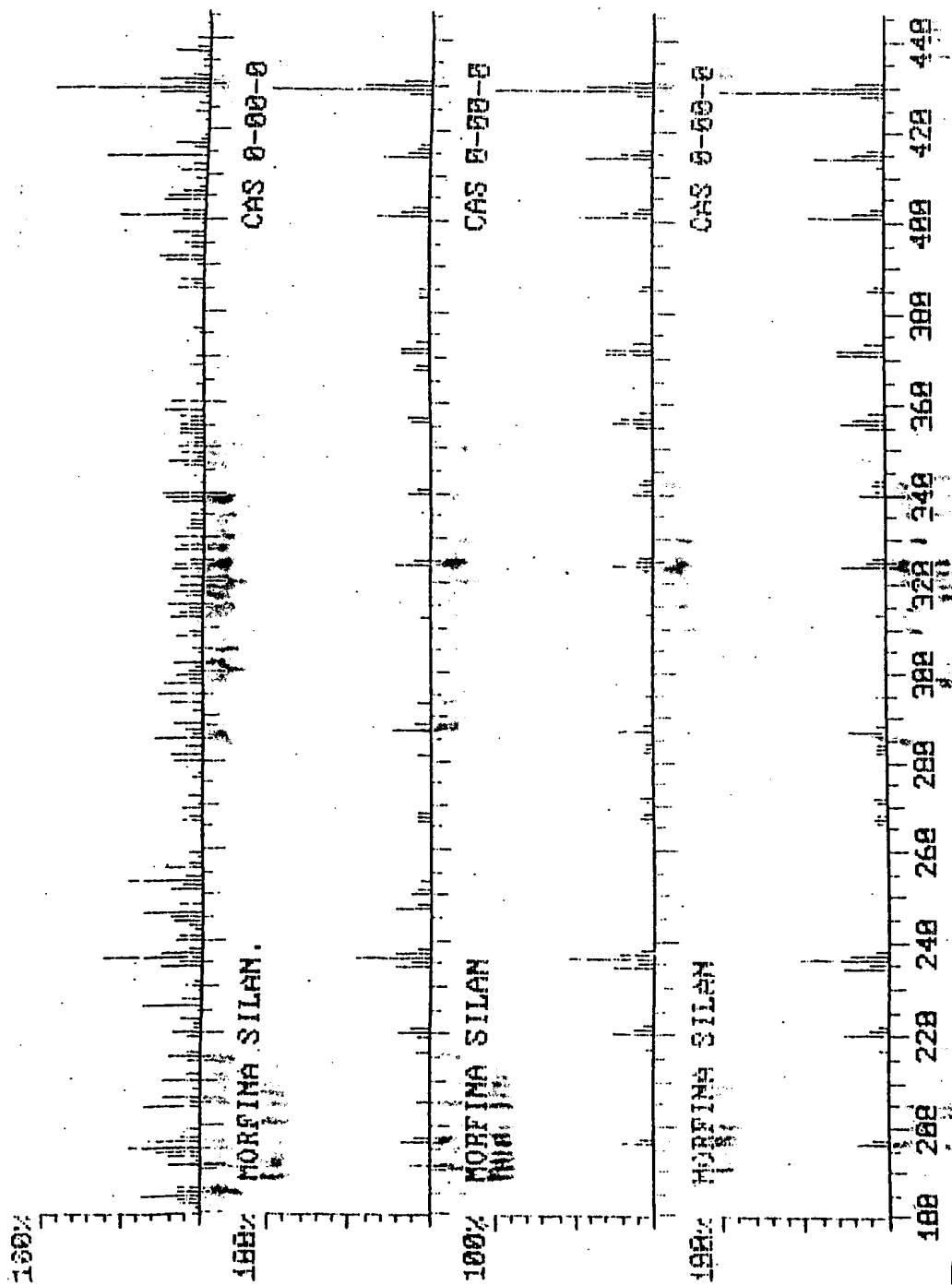
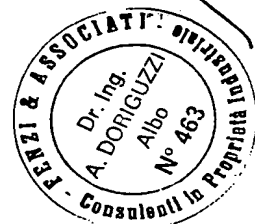


FIG. 4



UR99A000051

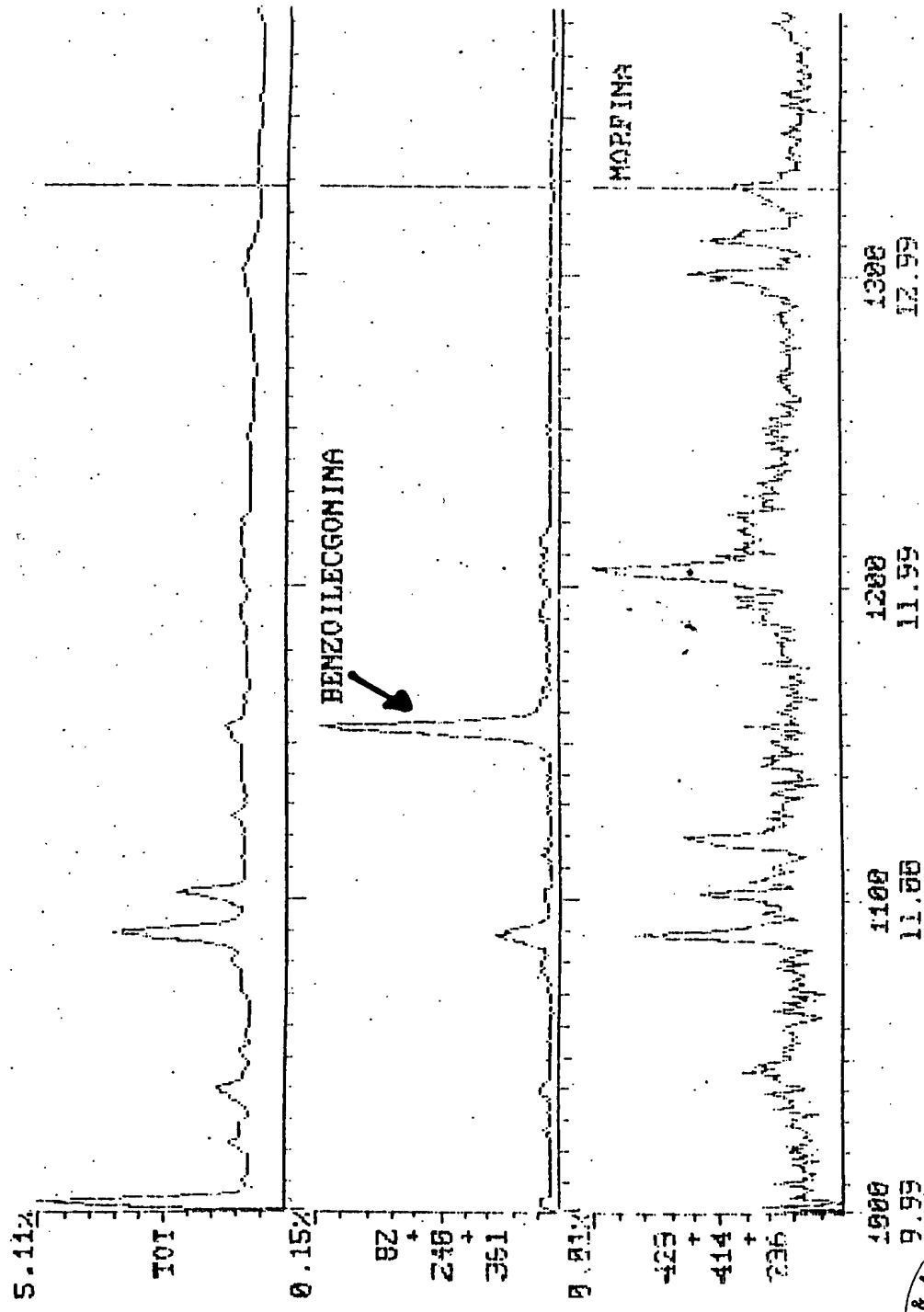
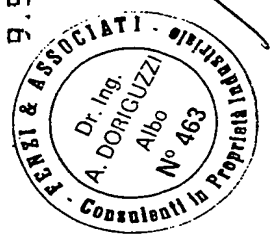
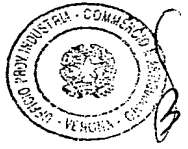


FIG. 5



[Handwritten signature]

UR99A 000059

TAV. 6/16

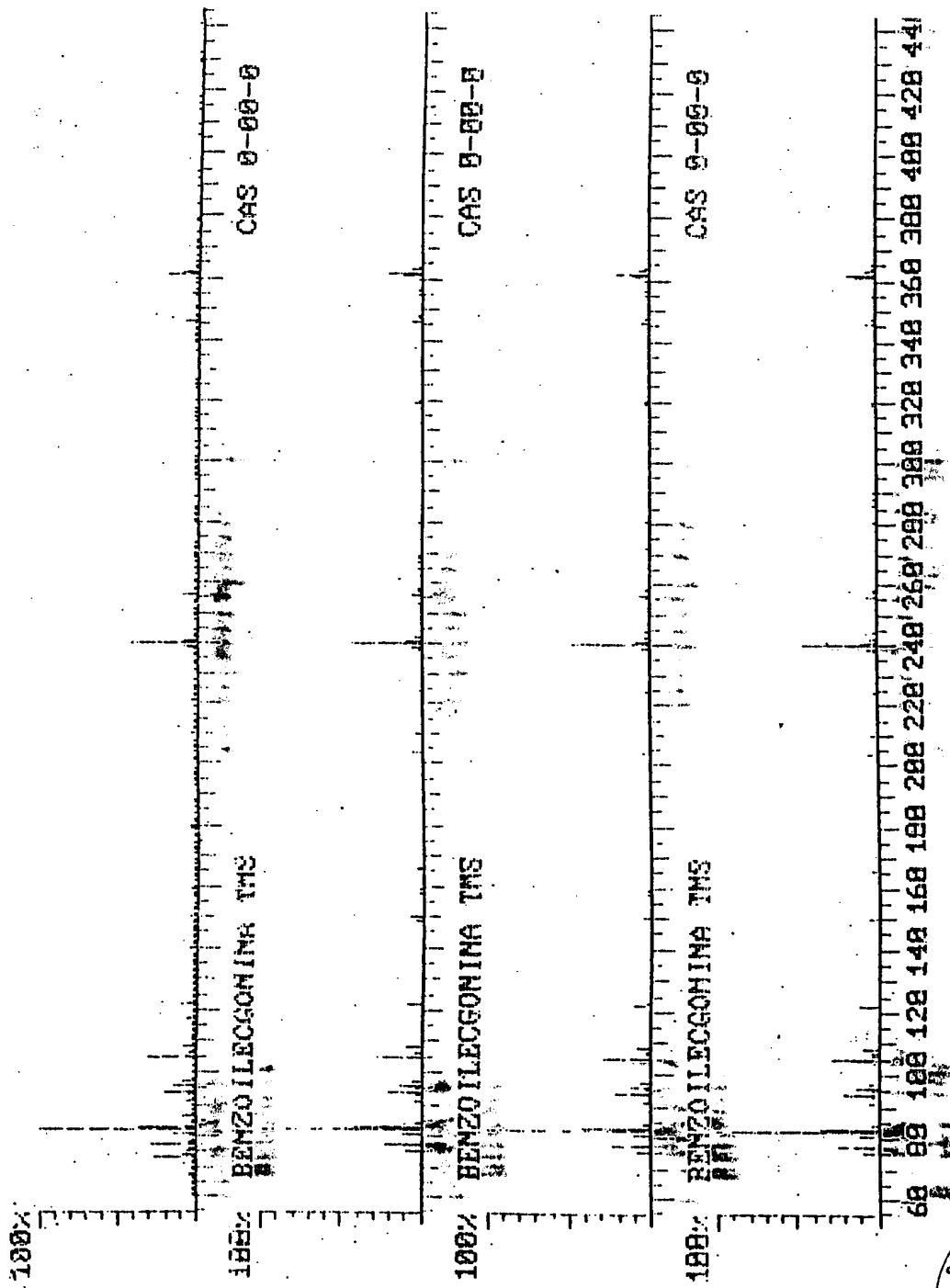


FIG. 6



UR99 1000059

TAV. 7/16

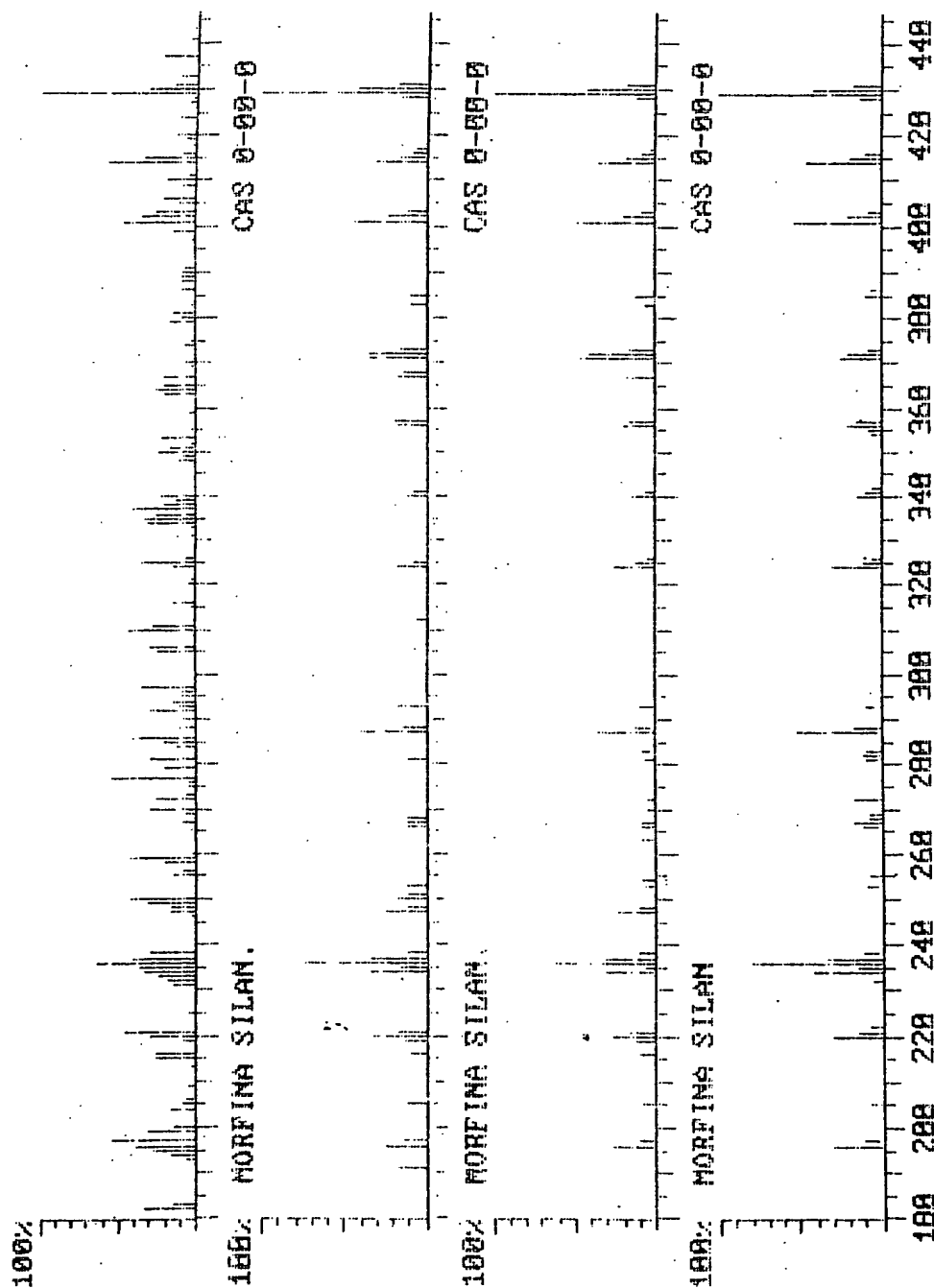
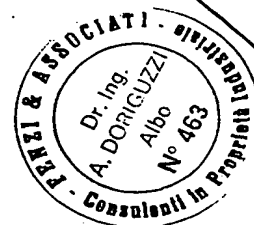
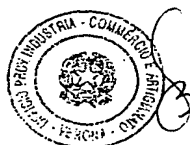


FIG. 7



UR99A000051

TAV. 8/16

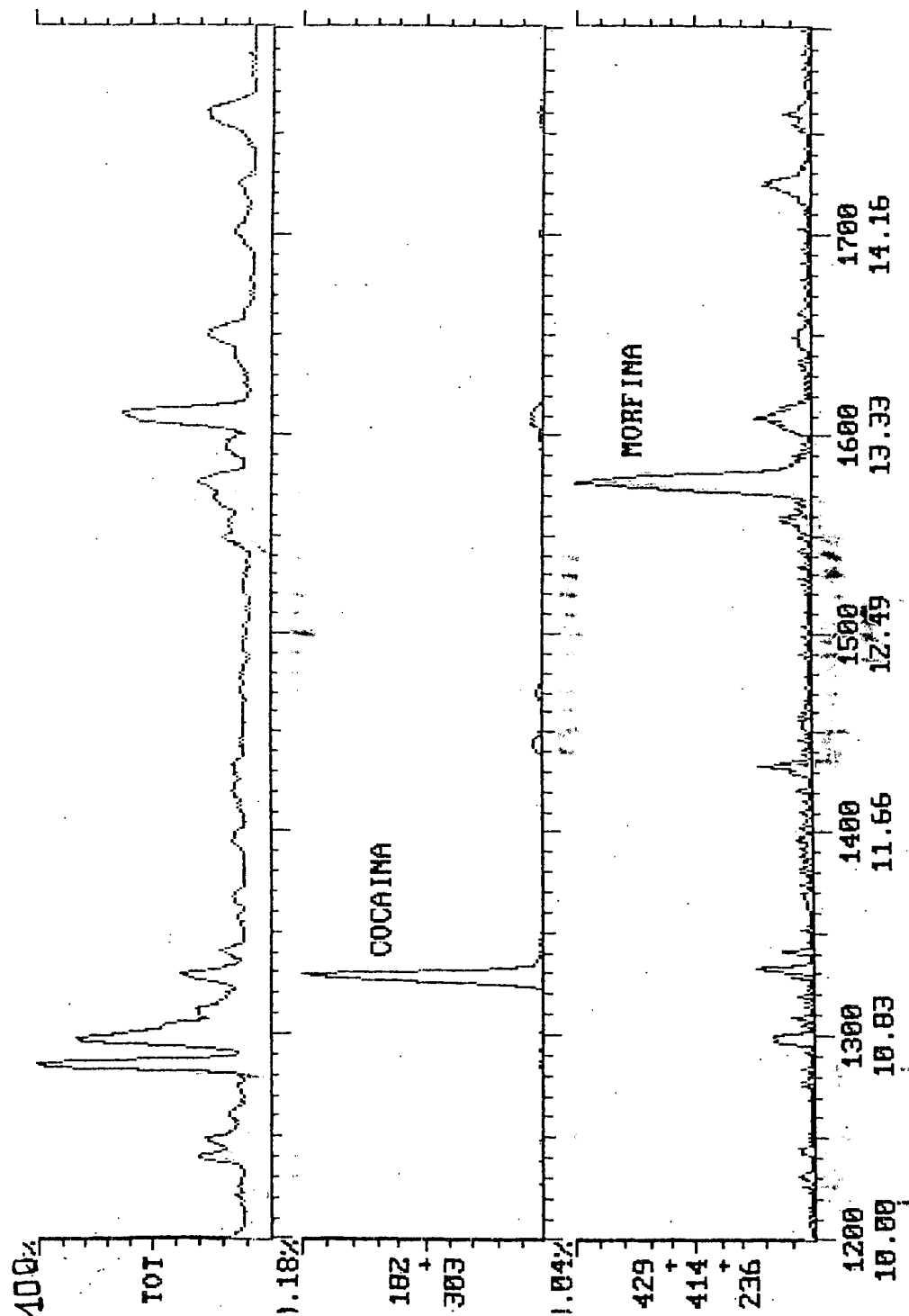
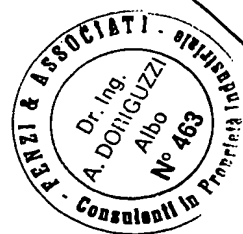
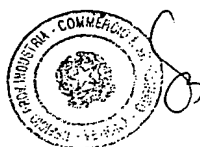


FIG. 8



TAV. 9/16

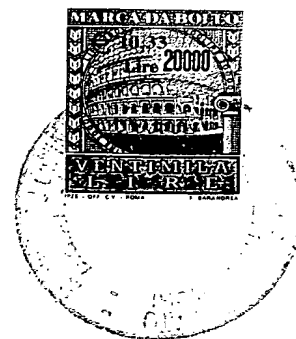
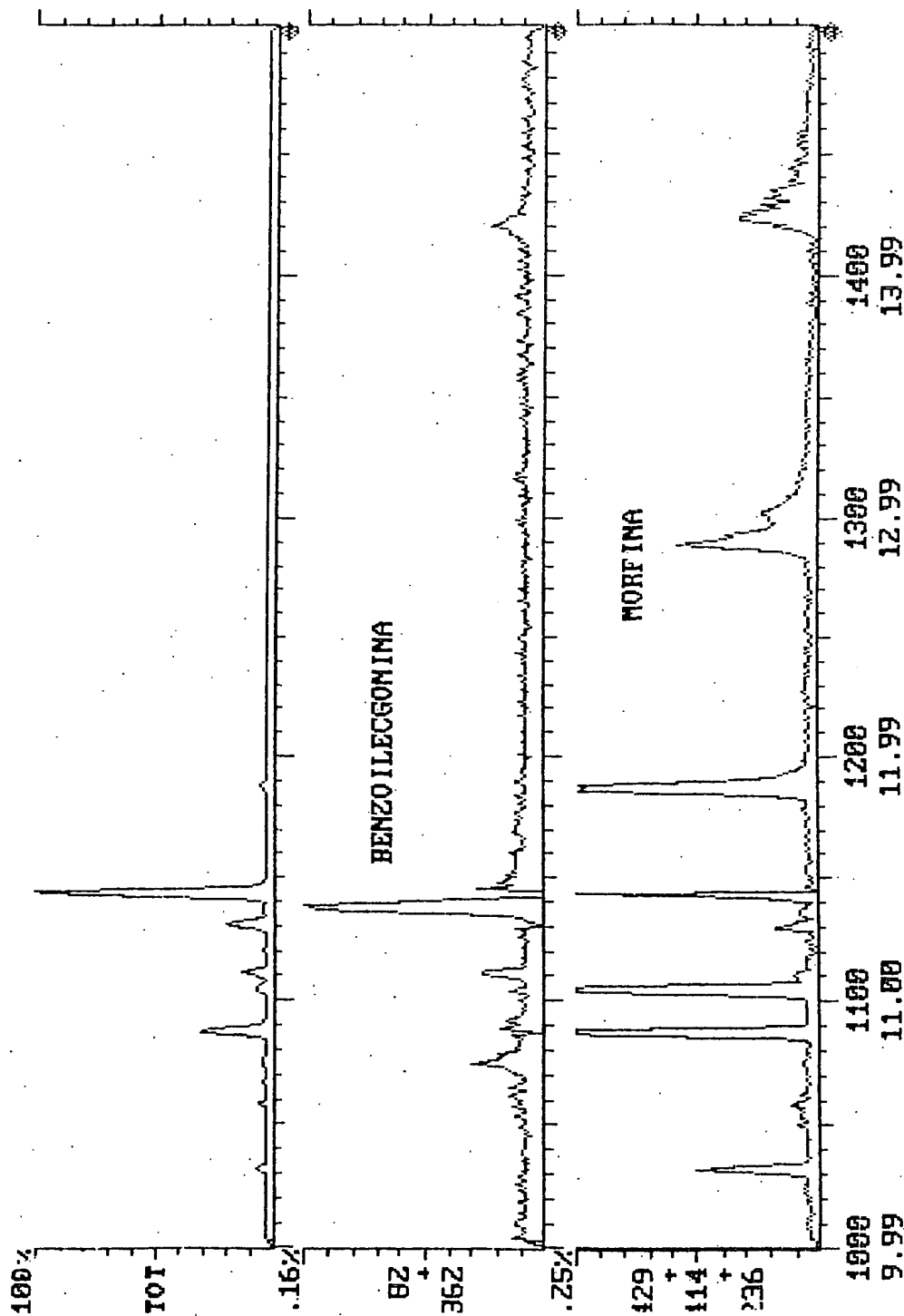
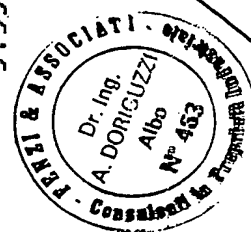


FIG. 9



VR99A 000059

TAV. 10/16

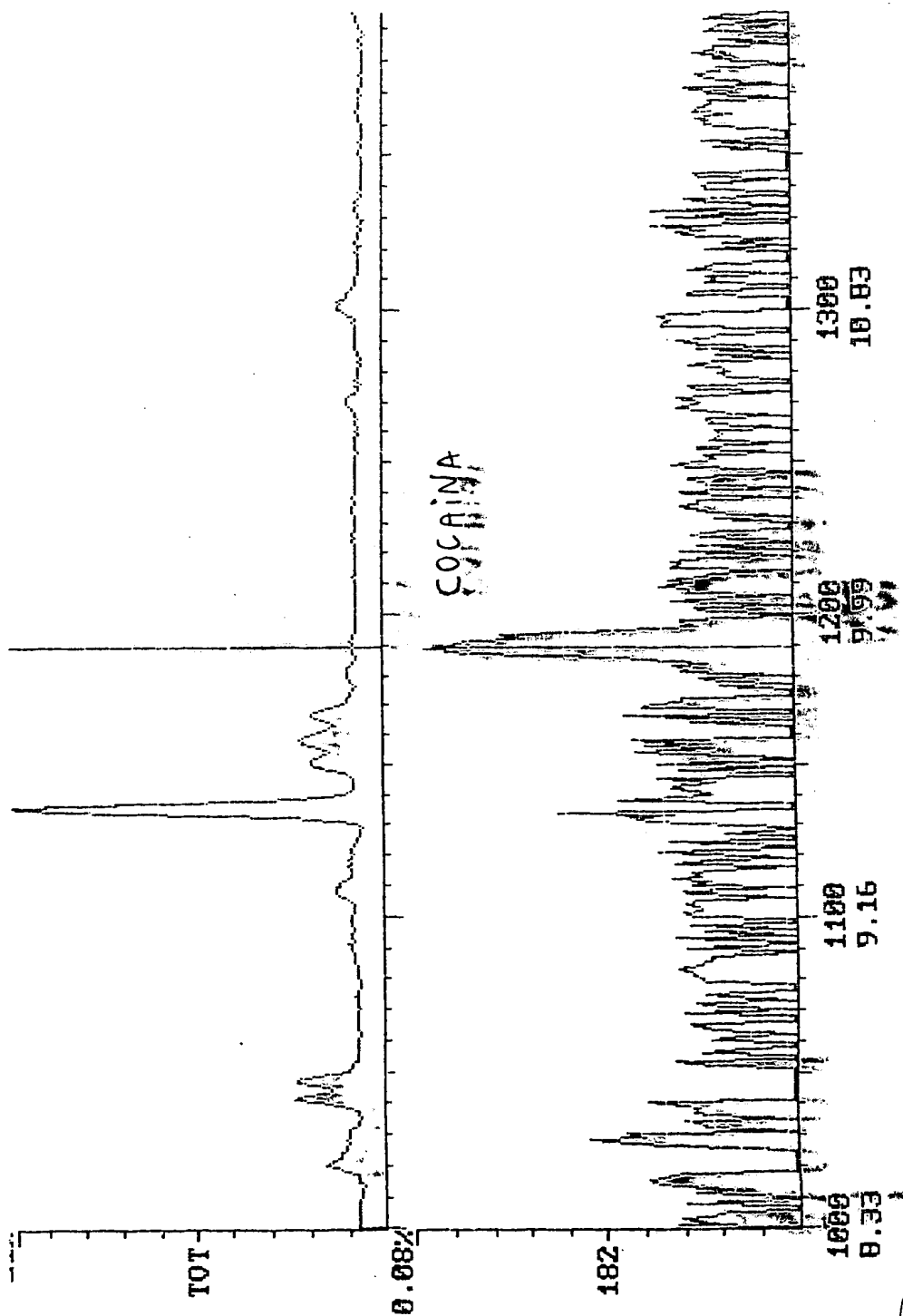


FIG. 10



URR/A000059

TAV. 11/16

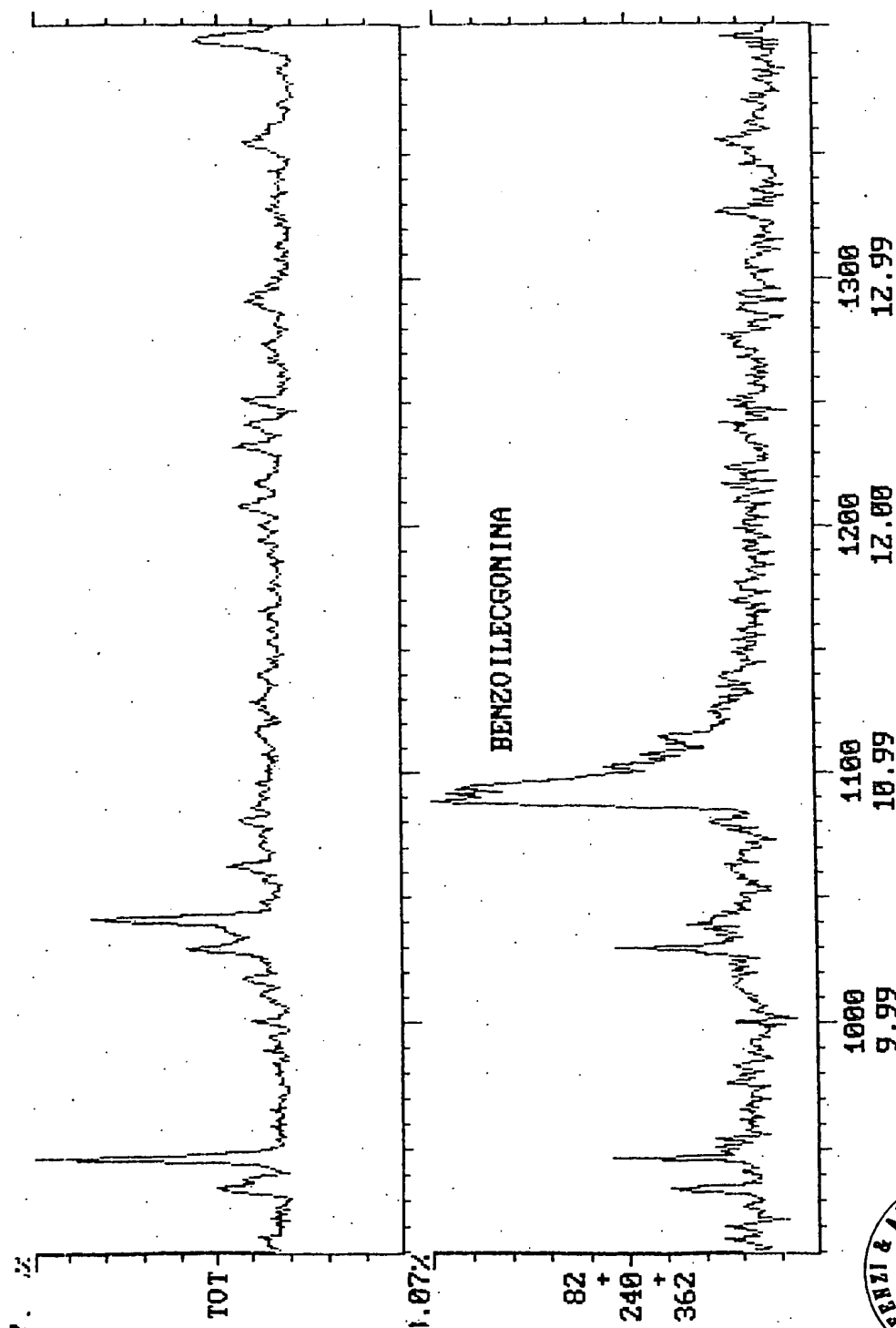


FIG. 11



Handwritten signature

UR99A 000059

TAV. 12/16

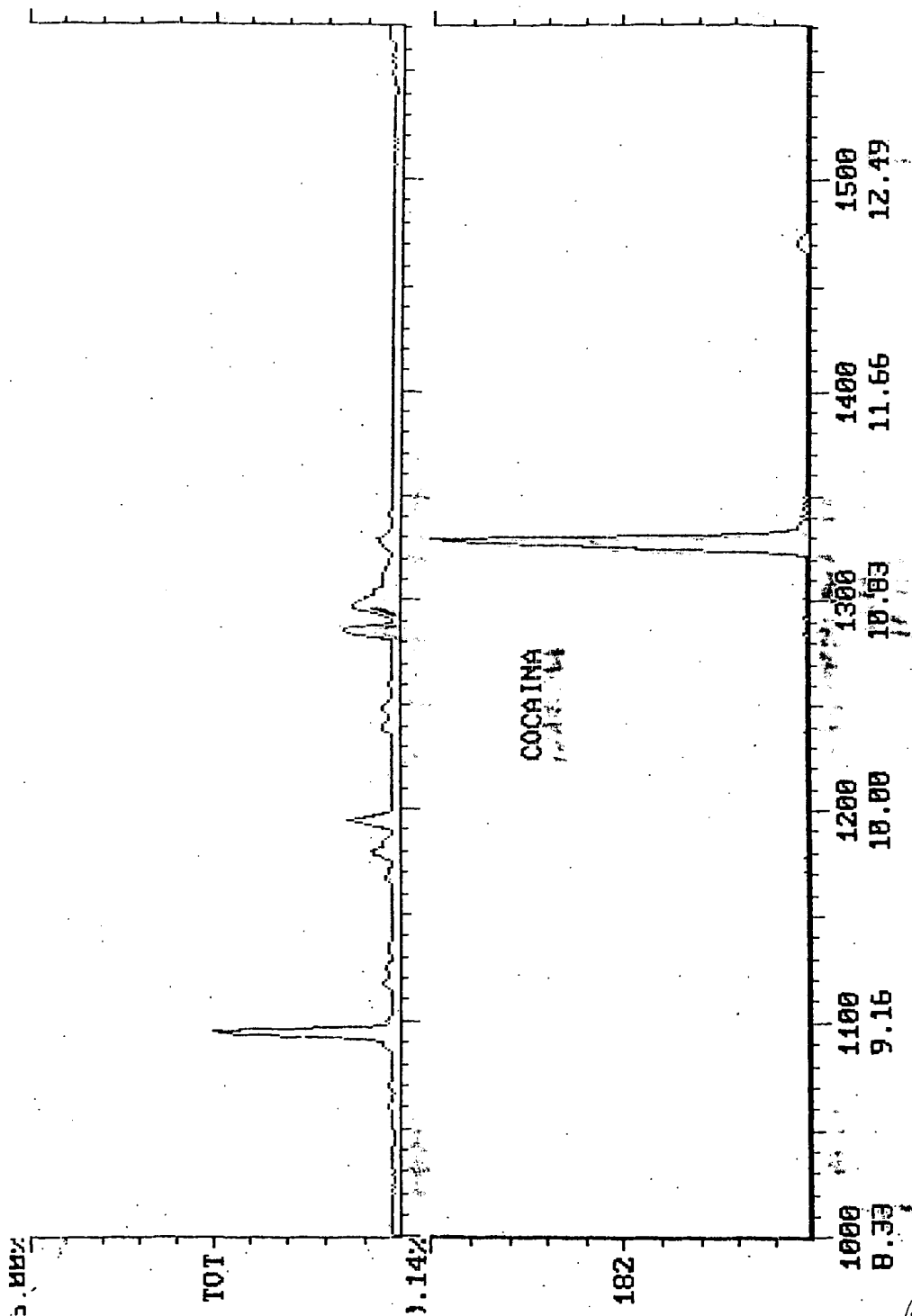
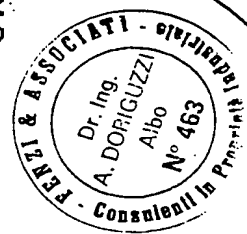
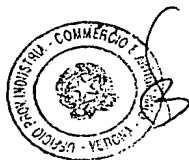


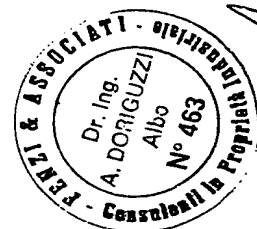
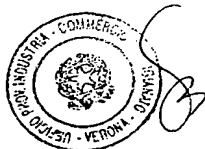
FIG. 12



TAV. 13/16



FIG. 13



281

UR99A000059

TAV. 14/16

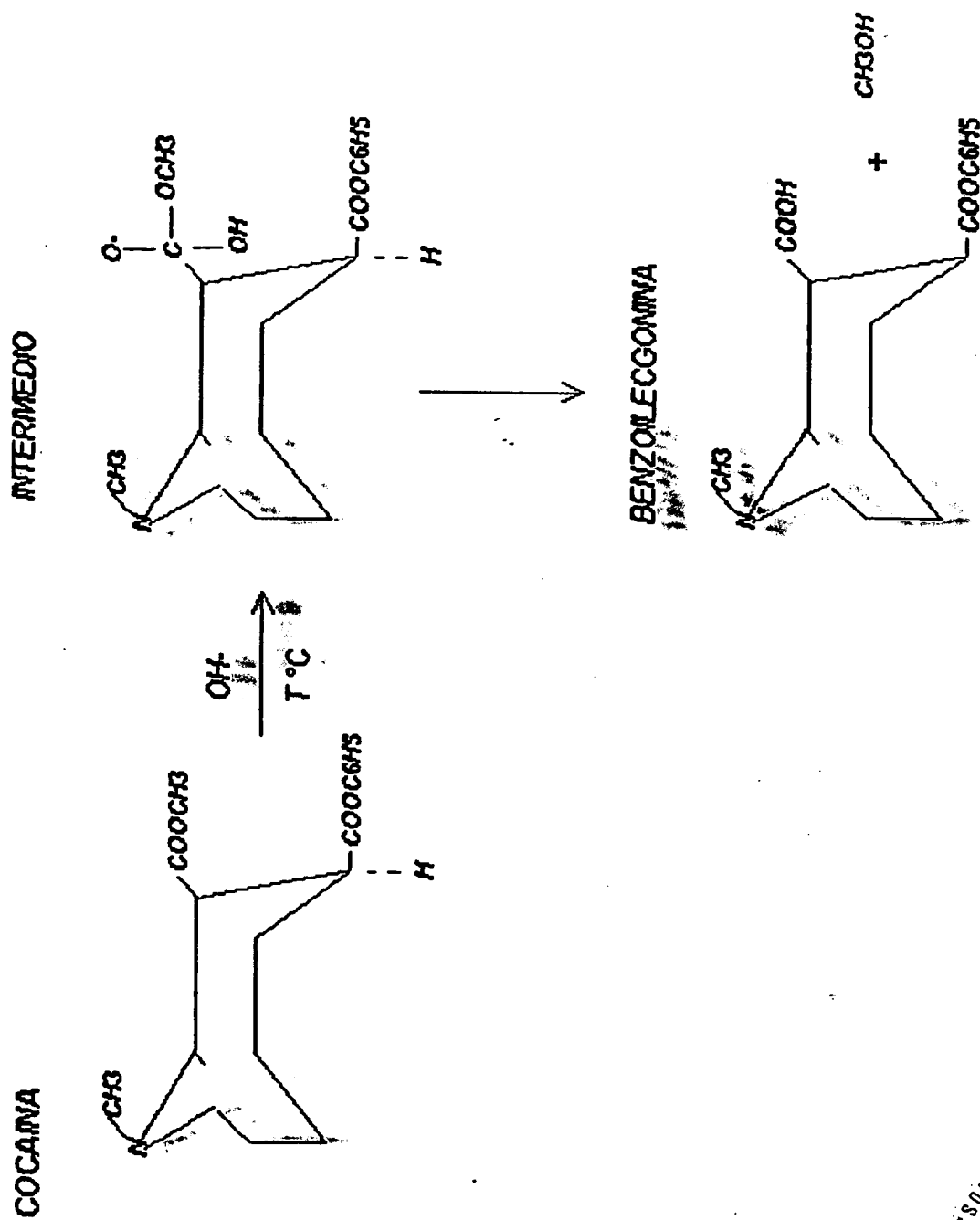
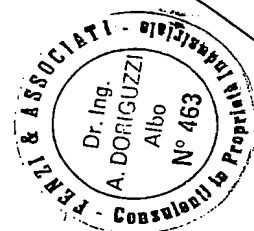
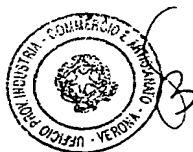


FIG. 14



UR99A000059

TAV. 15/16

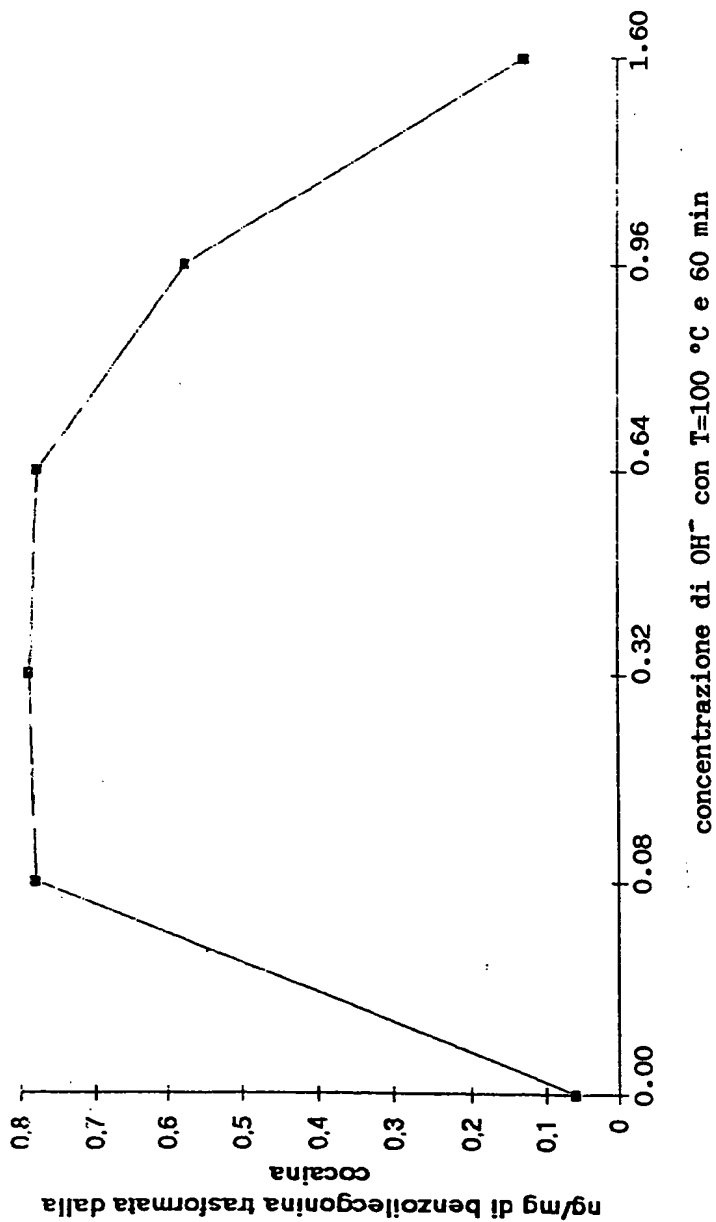
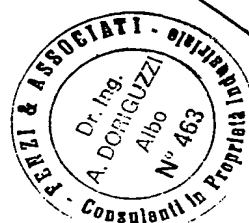


FIG. 15



UR99A000059

TAV. 16/16

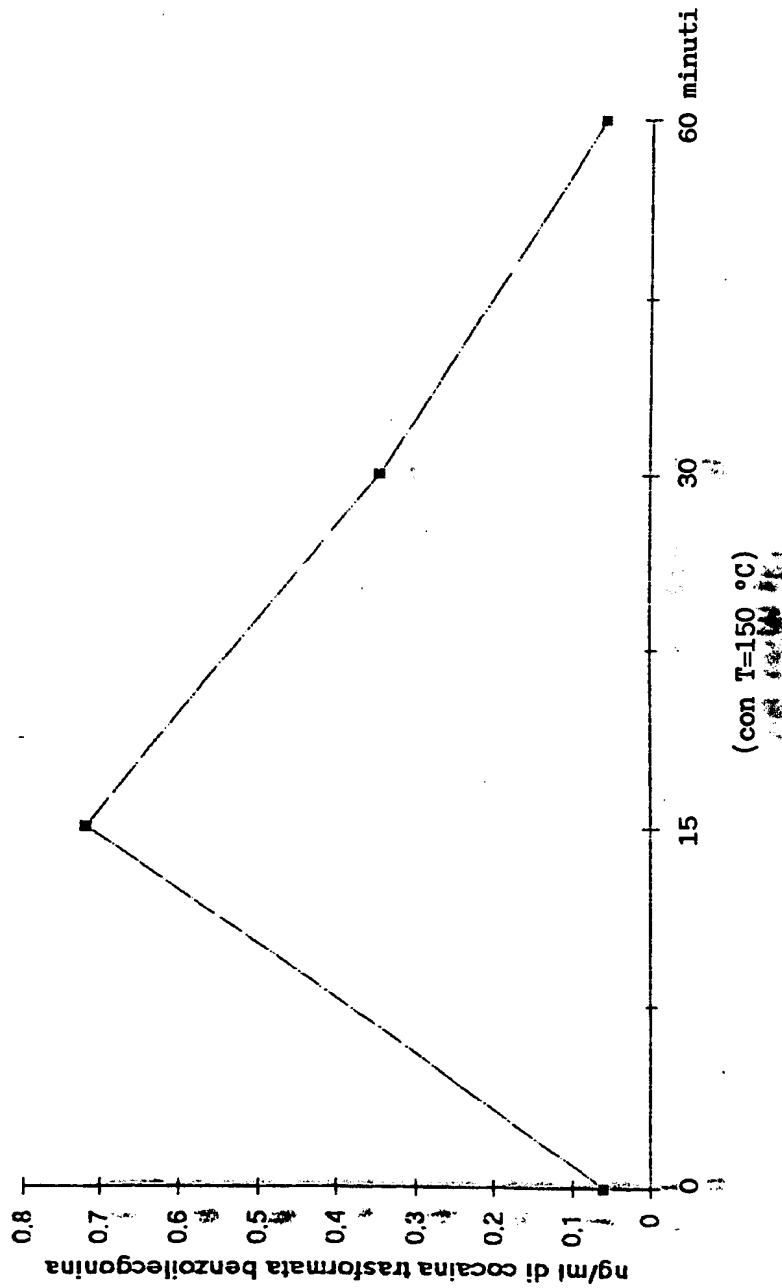


FIG. 16

